

EUROPEAN PATENT OFFICE

Patent Abstracts of Japan

PUBLICATION NUMBER : 05304977
PUBLICATION DATE : 19-11-93

APPLICATION DATE : 29-10-91
APPLICATION NUMBER : 03283069

APPLICANT : AGENCY OF IND SCIENCE & TECHNOL;

INVENTOR : KUNIOKA MASAO;

INT.CL. : C12P 21/02 //(C12P 21/02 , C12R 1:125)

TITLE : PRODUCTION OF GAMMA-POLYGLUTAMIC ACID

ABSTRACT : PURPOSE: To improve the yield and suppress the production of a by-product in producing θ -polyglutamic acid expectable of utilization in the field of medicines, foods, cosmetics, etc.

CONSTITUTION: The objective method for producing θ -polyglutamic acid is to include 1-10wt./vol.% glutamic acid, 1-10wt./vol.% citric acid and 0.1-2wt./ vol.% ammonium sulfate in a culture medium in fermenting and producing the θ -polyglutamic acid by using a microorganism which is a strain requiring biotin and belongs to the genus *Bacillus*.

COPYRIGHT: (C)1993,JPO&Japio

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平5-304977

(43) 公開日 平成5年(1993)11月19日

(51) Int. Cl.⁴

C 1 2 P 21/02

// (C 1 2 P 21/02

C 1 2 R 1:125)

識別記号

片内整理番号

P I

技術表示箇所

A 8214-4B

審査請求 未請求 請求項の数2(全4頁)

(21) 出願番号 特願平3-203009

(22) 出願日 平成3年(1991)10月29日

(71) 出願人 000005080

三菱製紙株式会社

東京都千代田区丸の内3丁目4番2号

(74) 上記1名の代理人 弁理士 浅村 皓 (外3名)

(71) 出願人 000001144

工業技術院長

東京都千代田区霞が根1丁目3番1号

(74) 上記1名の代理人 弁理士 浅村 皓 (外4名)

(72) 発明者 五嶋 輝夫

東京都千代田区丸の内3丁目4番2号 三菱製紙株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ギーポリグルタミン酸の製造法

(57) 【要約】

【目的】 医薬、食品、化粧品等の分野で利用が期待されるギーポリグルタミン酸を製造するにあたって、収率を向上させ、かつ副生成物の生産を抑制する方法を提供する。

【構成】 ビオチン要求性株のバチルス (Bacillus) 属微生物を用いてギーポリグルタミン酸を発酵生産する際に、培地に、グルタミン酸、クエン酸および硫酸アンモニウムをそれぞれ1~10wt/v%, 1~10wt/v%および0.1~2wt/v%含有させるギーポリグルタミン酸の製造法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ビオチン要求性株のパチルス (*Bacillus*) 属微生物を培地に接種し、好氣的培養を行い、γ-ポリグルタミン酸を発酵生産する方法において、該培地が、グルタミン酸、クエン酸および硫酸アンモニウムを含有していることを特徴とするγ-ポリグルタミン酸の製造法。

【請求項2】 グルタミン酸、クエン酸および硫酸アンモニウムの培地中の含有量がそれぞれ1~10wt/v%、1~10wt/v%および0.1~2wt/v%であることを特徴とする請求項1記載のγ-ポリグルタミン酸の製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、食品、化粧品、医薬等の分野で、増粘剤、バインダー、保潤剤、担体、除放性材料等に利用が期待されるγ-ポリグルタミン酸の、ビオチン要求性株のパチルス (*Bacillus*) 属微生物を用いた発酵による製造法に関する。

【0002】

【従来の技術】 微生物を用いたγ-ポリグルタミン酸の製造法として、特公昭43-24472号公報に記載の方法等が知られている。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 ビオチン要求性株のパチルス (*Bacillus*) 属微生物を培養してγ-ポリグルタミン酸を製造する方法に関して、ビオチンの他にグルタミン酸およびグルコースが必須因子であるという報告がある [日本農芸化学会誌, 36巻, 1000頁 (1962) 等]。しかし、発酵液中のγ-ポリグルタミン酸の蓄積量が少ないこと (数g/l)、さらにレバン (フルクトースの重合体) を生成する等の問題点があった。

【0004】

【課題を解決するための手段】 本発明者は、ビオチン要求性株のパチルス属 (*Bacillus*) 微生物を培養してγ-ポリグルタミン酸を発酵生産する際に、培地中にグルタミン酸、クエン酸および硫酸アンモニウムを含有させることによって、レバンの生成を抑え、高収率でγ-ポリグルタミン酸を生産できることを見いだした。以下に本発明を詳細に説明する。なお、以下で示される%は、wt/v%のことである。

【0005】 本発明に使用できる微生物は、ビオチン要求性のパチルス属 (*Bacillus*) 微生物でγ-ポリグルタミン酸を発酵液中に蓄積する菌株であればいずれも使用可能である。代表的なものとしてパチルス・ズブチリス (*Bacillus subtilis*) が挙げられ、その具体例としてIFO3009株、同3013株、同3335株、同3336株、同3936株、同13169株、ATCC15245株等が挙げられるがこ

れらに限定されない。

【0006】 本発明に使用するグルタミン酸の含有量は、好ましくは1~10%、更に好ましくは2~5%である。含有量が少ないと、γ-ポリグルタミン酸の生産量が少なかったり、あるいは全く生産しない、また、含有量が多いと菌が増殖しない場合があり、増殖しても発酵液中に多量のグルタミン酸が残存し効率が良くない。用いられるグルタミン酸は、アルカリ金属塩 (例えば、ナトリウム塩) の形で差し支えない。

【0007】 本発明に使用するクエン酸の含有量は、好ましくは1~10%、更に好ましくは2~5%である。含有量が少ないと、γ-ポリグルタミン酸の生産量が少ないばかりでなく、レバンの生成比率が高くなる。また、含有量が多いと菌が増殖しない場合があり、増殖しても発酵液中に多量のクエン酸が残存し効率が良くない。用いられるクエン酸は、アルカリ金属塩 (例えば、ナトリウム塩) の形で差し支えない。

【0008】 本発明に使用する硫酸アンモニウムの含有量は、好ましくは0.1~2%、更に好ましくは0.2~1%である。硫酸アンモニウムを含有させなくともγ-ポリグルタミン酸を生産するが、少量であり、レバンの生成比率が高い。含有量が多いと、菌が増殖せずγ-ポリグルタミン酸を生産しない。

【0009】 本発明に使用する培地には、上記のグルタミン酸、クエン酸、硫酸アンモニウムの他に、適量のビオチンおよび無機物が用いられる。無機物としてはリン酸イオン、ナトリウムイオン、カリウムイオン、マグネシウムイオン、カルシウムイオン、鉄イオン、マンガンイオン等が挙げられ、これらは0.001~1%の範囲で含有される。

【0010】 培養は、好氣的条件下で、振とう培養、攪拌培養などで行う。培養温度は、25~45℃が好ましく、30~40℃が更に好ましい。培養液は中性付近が好ましく、pH6~8が適当である。pHの調整には、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、塩酸、硫酸などを用いて行う。通常、1~5日間の培養でγ-ポリグルタミン酸は発酵液中に蓄積される。

【0011】 上記発酵液からのγ-ポリグルタミン酸の単離は、公知の方法により行うことができる。すなわち、遠心沈降、自然沈降、微細孔を有するフィルター濾過等により菌体を除去した後、3~4倍容のエタノール、メタノール、アセトン等の親水性有機溶媒を添加して得た沈澱物を水に溶解し不溶物を除去し、低分子化合物を透析、膜外濾過等により除去して単離する方法や、菌体を除去した発酵液をpH6.5付近に調整し、飽和硫酸銅水溶液を添加して沈澱させる方法により行うことができる。

【0012】

【実施例】 次に、本発明を実施例により更に詳細に説明する。

【0013】実施例1

グルタミン酸3g、クエン酸2g、硫酸アンモニウム0.5g、KH₂PO₄0.1g、Na₂HPO₄・12H₂O0.1g、MgSO₄・7H₂O0.05g、MnSO₄・nH₂O0.002g、FeCl₃・6H₂O0.005g、ビオチン50μgを蒸留水に溶かしたpH7.5（水酸化ナトリウムで調整）の培地100mlを調製し、500ml瓶口フラスコに入れ、121℃、15分間蒸気殺菌後、バチルス・ズブチリスIFO3335株（*Bacillus subtilis*）を接種し、37℃、72時間、120回/分で好氣的振とう培養を行った。

【0014】発酵液を遠心沈降によって除菌した後、4倍容のメタノールを加え、生じた沈降物を回収した。この沈降物を蒸留水100mlに溶解し、不溶物を遠心分離によって除いた後、透析を行い、凍結乾燥してγ-ポリグルタミン酸の白色粉末1.06gを得た。また、ゲル濾過クロマトグラフィーにより、分子量は約110万、γ-ポリグルタミン酸/レバン比は99/1（差示屈折計で検出したピーク面積より算出した）であった。

【0015】実施例2

グルタミン酸量を5gとしたこと以外は実施例1と同様に培養を行い、γ-ポリグルタミン酸の白色粉末0.80gを得た。分子量は約80万、γ-ポリグルタミン酸/レバン比は99/1であった。

【0016】実施例3

グルタミン酸量を2gとしたこと以外は実施例1と同様に培養を行い、γ-ポリグルタミン酸の白色粉末0.78gを得た。分子量は約105万、γ-ポリグルタミン酸/レバン比は99/1であった。

【0017】実施例4

クエン酸量を5gとしたこと以外は実施例1と同様に培養を行い、γ-ポリグルタミン酸の白色粉末0.75gを得た。分子量は約150万、γ-ポリグルタミン酸/レバン比は99/1であった。

【0018】実施例5

硫酸アンモニウム量を0.2gとしたこと以外は実施例1と同様に培養を行い、γ-ポリグルタミン酸の白色粉末0.80gを得た。分子量は約30万、γ-ポリグルタミン酸/レバン比は94/6であった。

【0019】実施例6

硫酸アンモニウム量を1gとしたこと以外は実施例1と同様に培養を行い、γ-ポリグルタミン酸の白色粉末1.12gを得た。分子量は約200万、γ-ポリグルタミン酸/レバン比は100/0であった。

【0020】実施例7

バチルス・ズブチリスIFO3335株（*Bacillus subtilis*）の代わりにバチルス・ズブチリスIFO13169株を用いたこと以外は実施例1と同様に培養を行い、γ-ポリグルタミン酸の白色粉末1.03gを得た。分子量は約120万、γ-ポリグルタミン酸/レバン比は97/3であった。

【0021】比較例1

グルタミン酸3g、硫酸アンモニウム0.5g、KH₂PO₄0.1g、Na₂HPO₄・12H₂O0.1g、MgSO₄・7H₂O0.05g、MnSO₄・nH₂O0.002g、FeCl₃・6H₂O0.005g、ビオチン50μgを蒸留水に溶かしたpH7.5（水酸化ナトリウムで調整）の溶液50mlを調製し、500ml瓶口フラスコに入れ、121℃、15分間蒸気殺菌を行った。さらにグルコース2gを蒸留水に溶かしたpH7.5（水酸化ナトリウムで調整）の液50mlを調製し、ろ過滅菌を行ない、前記溶液に加え培地とした。以下は実施例1と同様に培養を行い、γ-ポリグルタミン酸の白色粉末0.15gを得た。分子量は約140万、ポリグルタミン酸/レバン比は77/23であった。

【0022】比較例2

グルタミン酸を添加しないこと以外は実施例1と同様に培養を行ったが、γ-ポリグルタミン酸は得られなかった。

【0023】比較例3

クエン酸を添加しないこと以外は実施例1と同様に培養を行ったが、γ-ポリグルタミン酸は得られなかった。

【0024】比較例4

硫酸アンモニウムを添加しないこと以外は実施例1と同様に培養を行い、γ-ポリグルタミン酸の白色粉末0.09gを得た。分子量は約10万、γ-ポリグルタミン酸/レバン比は76/24であった。

【0025】比較例5

バチルス・ズブチリスIFO3335株（*Bacillus subtilis*）の代わりにバチルス・ズブチリスIFO13169株を用いたこと以外は比較例1と同様に培養を行い、γ-ポリグルタミン酸の白色粉末0.10gを得た。分子量は約110万、γ-ポリグルタミン酸/レバン比は81/19であった。

【0026】

【発明の効果】実施例から明らかなように、本発明の製造法により、γ-ポリグルタミン酸の収率が向上し、さらにレバンの産生を大幅に抑制できた。

フロントページの続き

(73)発明者 西岡 正雄

茨城県つくば市東1丁目1番4 工業技術
院 繊維高分子材料研究所内